

⑬ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭56-79957

⑪ Int. Cl.<sup>3</sup>  
G 01 N 33/54

識別記号

庁内整理番号  
7906-2G

⑭ 公開 昭和56年(1981)6月30日

発明の数 2  
審査請求 未請求

(全 4 頁)

⑮ エルシニア・エンテロコリタイカ多糖体感作  
血球およびこれを用いるエルシニア・エンテ  
ロコリタイカ多糖体抗体の検出方法

東京都練馬区大泉学園町163-  
2

⑯ 出 願 人 株式会社相互生物医学研究所  
東京都中野区中央4丁目25番10  
号

⑰ 特 願 昭54-157909  
⑱ 出 願 昭54(1979)12月5日  
⑲ 発 明 者 富山哲雄

⑳ 代 理 人 弁理士 若田勝一

明 細 書

1. 発明の名称

エルシニア・エンテロコリタイカ多糖体感作  
血球およびこれを用いるエルシニア・エンテ  
ロコリタイカ多糖体抗体の検出方法

2. 特許請求の範囲

- (1) 固定赤血球にカップリング剤を介してエル  
シニア・エンテロコリタイカ多糖体を結合さ  
せて成るエルシニア・エンテロコリタイカ多  
糖体感作血球。
- (2) カップリング剤がタンニン酸である特許請  
求の範囲外1項記載のエルシニア・エンテ  
ロコリタイカ多糖体感作血球。
- (3) 固定赤血球にカップリング剤を介してエル  
シニア・エンテロコリタイカ多糖体を結合さ  
せて成る感作血球をヒトの体液もしくはその  
希釈液と接触させ、マイクロタイター法によ  
って凝集像を観察することを特徴とするエル  
シニア・エンテロコリタイカ多糖体抗体の検  
出方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、赤血球にカップリング剤を介して  
エルシニア・エンテロコリタイカ多糖体を結合  
させて成るエルシニア感作赤血球凝集反応用感  
作血球およびこれを用いるエルシニア・エンテ  
ロコリタイカ多糖体抗体の検出方法に関するも  
のである。

エルシニア・エンテロコリタイカ (*Yersinia  
enterocolitica* , 以下エルシニアと略記する) は  
腸内細菌に属するグラム陰性の桿状で、ヒトに  
感染して、肺炎、敗血症、腸炎、結節性紅斑、  
関節炎、敗血症をはじめ、時には肝臓病、脾臓  
病、骨髄炎などを起こす。本菌の感染症すなわ  
ち、エルシニア症の病型は広範囲且つ極めて多  
彩であり、特有の臨床所見を示さない疾患であ  
る。従つて、エルシニア症を診断する為には、  
エルシニアの分離又は血清学的検査法にたよら  
なければならない。このうち、細菌の分離は急  
性期の化学療法前に行なわないとほとんど分離  
することができないこと、又、本菌が好気細菌

であり、且つ発育の遅い細菌である為に、必ずしも高率に診断できていない。又、血清反応としては、加糖又はホルマリン死菌を用いる菌体凝集反応が多く用いられているが、この方法は感度が十分でない点の他に、エルシニア菌の有する腸内細菌共通抗原に対する抗体によつても凝集がおこる為、特異性において劣る欠点があつた。

しかし、本菌の多価体は型特異的であつて、他の細菌と交叉することがない特異抗原であることがよく知られているので、エルシニア抗体固定の為に抗原の抗原であると云える。

本発明者は上記した従来のエルシニア菌診断法における欠点を克服すべく鋭意研究を行なつた結果、赤血球にカップリング剤を介してエルシニア型特異抗原である多価体を結合させた感作血球を用い、受身血球凝集反応により、高感度でしかも特異的にエルシニア菌を識別診断することが可能であることを見出し本発明を完成するに至つた。

( 3 )

も高い抗体価がえられる。これらの各抗原の調製法はすでによく知られている通りである。すなわち、Boivin 抗原は、州体を氷冷下でトリクロロール酢酸で処理し、遠心上清のエタノール沈殿として得られる。菌体質は菌体から約70℃でフェノール抽出し、遠心して、その水層より調製できる。アルカリ多価は0.25Nのカセイソーダ中で多価体を抽出し、更に、エタノール沈殿、アセトン沈殿などによつて精製される。その他、EDTA ( Ethylenediamine tetra acetic acid, sodium salt ) によつても抽出される。

これらの多価体はいずれもエルシニアの血清型に特異性を示し、他の腸内細菌との共通抗原性を示さず、しかも固定赤血球によく感作することが出来る。

本発明の感作血球を製造するには次の様に行なり。すなわち、カップリング剤を用いて赤血球を処理し、カップリング剤処理血球(赤血球表面にカップリング剤が結合した赤血球)を得これにエルシニア多価体を含む液を接触させて

特開昭56-79957(2)

本発明の目的は、オ1に赤血球にカップリング剤を介してエルシニア多価体を結合して成るエルシニア菌診断用感作血球を提供することであり、オ2にこれを用いたエルシニア多価体抗体の検出方法を提供することである。

本発明の感作血球に用いる赤血球は固定赤血球であるが、これに用いる赤血球はヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマ、モルモット、ニワトリ、七面鳥、ヒトなどから従来の方法に従つて得られる。固定赤血球は例えば次の様にして調製される。すなわち、アルセバー ( Alsever ) 液に懸濁させた生赤血球を一酸化炭素ガスで処理し、この赤血球にホルマリンを加えて固定を行なう。カップリング剤としてはタンニン酸、グルタルアルデヒド、塩化クロムなどが使用できるが、中でもタンニン酸が好ましい。

赤血球に感作するエルシニア多価体はボアバン抗原 ( Boivin Antigen )、菌体質、アルカリ多価体のいずれでもよく、どの抗原もエルシニアの血清型特異的抗原であるがアルカリ多価は最

( 4 )

エルシニア多価体感作血球を得る。かくして得られた本発明の感作血球を長期に亘つて保存するには感作血球を保存液中に懸濁させて保存してもよく、あるいは保藏剤を含む液体と共に凍結乾燥して、凍結乾燥品として保存してもよい。凍結乾燥品の場合は使用に際しては感作血球に希釈剤を加えて診断液を調製する。

赤血球をカップリング剤で処理することなく抗原と接触させた場合には赤血球に抗原が結合しないこと、本発明の感作血球がエルシニア抗体に対し特異的に反応して血球凝集を起すが、未感作血球は反応しないことから本発明の感作血球は赤血球にカップリング剤を介してエルシニア多価体が結合したものであると見える。

本発明の感作血球を用いたエルシニア菌の診断は、本発明の感作血球悬浮液をヒトの血清もしくはその希釈液と接触させ受身血球凝集反応に基づき菌体凝集を調製することにより行なりが、手括としてはマイクロタイター法によるのが最も好ましく、本発明の感作血球を用いた

( 5 )

( 6 )

マイクロタイター法によれば、(1)手技が極めて簡単であり；(2)わずか1~2時間で判定が可能；(3)感度が高いという利点がある。すなわち本発明は、従来エルシニア症の診断に用いられたことのない固定赤血球による受身血球凝集反応を用いた血液およびその製法を提供し、本発明の感作血球を用いた診断法によつてエルシニア多価抗体の検出を高感度迅速にし、患者の診断を容易にしたのはもちろんのこと引いては、ヒトの抗体測定によるエルシニア症の流行状態など公衆衛生上、疫学上の發端に充てることのできる他、明確な血液から特異的血清凝集用のガンマーグロブリン凝集剤を調製する時の抗体スクリーニングにも有用である。エルシニア多価抗体を固定赤血球に感作した例は文献未報であり、これを用いる受身赤血球凝集反応は全く新規なものである。以下、実施例を示して本発明をさらに詳しく説明する。

#### (4) 抗原の調製

##### 1) ボアパン抗原の調製

( 7 )

##### 3) アルカリ多価の調製

10gの乾燥菌体を200mLの0.25N NaOHに懸濁し、56℃5時間抽出した後遠心して上清を採り、冷却後エタノール20容を加え一夜氷室にかけた後遠心して沈澱を集め、アセトン洗浄をした後乾燥し、これを0.25Nトリクロール酢酸に懸濁し、氷室に3時間保つた後遠心して上清を取り、pHを中性とした後、エタノール沈澱、およびフェノール抽出を行なつてアルカリ多価をえた。

##### (4) 固定赤血球の調製

ニュートリから得られた新鮮血液にアルセバ- (Alsever) 液を等量加え、プラスチック中で窒素ガス(COガス含有)を30分間ふき込んだ後順次に固定液(5%のクエン酸ソーダを加えた生理食塩水+3%ホルマリン(容積比29:1))を等量加え、37℃の定温器中で24時間放置するが、この間時々振とう

( 9 )

##### ミユラー-ヒントン培地 (Mueller-Hinton

Agar) で30℃4日間培養したエルシニア・エンテロコリチイカ3型菌の菌体を集めて生理食塩水で3回洗浄し、100℃30分加熱した後、減圧で乾燥し、菌体を得た。この菌体を氷冷した0.25Nのトリクロール酢酸に懸濁し、3時間氷冷し乍ら抽出し、遠心して上清を分取した。この上清にエタノール2容を加え、一夜氷冷後沈澱を分取し、水に対して透析した後遠心して上清をボアパン抗原とした。

##### 2) 糖脂質の調製

乾燥菌体10gを70℃蒸留水200mLに懸濁し、これに70℃加熱した90%フェノール200mLを加え、15分反応させた後、冷却し遠心して上層の水層を分取し、これを水に対し3日間透析した。3000rpm30分遠心した上清を30000rpm5時間遠心して沈澱を取り、糖脂質を得た。

( 8 )

する。その後純水で5回、生理食塩水で5回洗浄する。ナトリウムアジドを0.1%加えたpH7.2のリン酸緩衝生理食塩水に10%になるように固定赤血球を懸濁させ氷室に保存する。この固定赤血球は1年以上安定であった。

##### (4) 感作血球の調製

前記(4)において得られた固定赤血球を2%含むリン酸緩衝生理食塩水(pH7.2, 以下PBSと称す)に1:100000のタンニン酸/PBSを等量加え、37℃で15分間タンニン酸処理を行なつた後、PBSで1回洗浄し、原量のPBSに懸濁させてタンニン血球液を調製した。このタンニン血球液に等量の、前記(4)において得られた抗原液を加え、37℃で30分間処理した後、PBSで1回、pH7.2のPBSにBSA 1%, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 0.1%を加えた希釈液で1回洗浄し原量の半量の凍結乾燥管(上記希釈液にグリシン0.5%, デキストラン(和光純薬, 分子量200000~300000) 0.7%を

( 10 )

加えたもの)に懸濁し凍結乾燥する。

本反応を従来の固相凝集反応と比較すると次の通りである。

抗体はエルシニア罹患者血清である。

反 応	抗体価
受身血球凝集反応, ポアパン抗原	1:6400
、 糖 脂 質	1:12800
、 アルカリ多糖	1:25600
、 対照(未感作)	1:40以下
固相凝集反応	1:800

上記のようにこの血球凝集反応は従来行なわれている固相凝集反応に比較して、ポアパン抗原で8倍、糖脂質で16倍、アルカリ多糖で32倍の感度を示し、又、未感作の対照血球では完全な陰性を示した。

特許出願人 株式会社 相互生物医学研究所

代理人弁護士 若 田 勝 一

( 1 1 )

## End of Result Set



Generate Collection

Print

LB: Entry 2 of 2

File: DWPI

Jun 30, 1981

DERWENT-ACC-NO: 1981-59741D  
 DERWENT-WEEK: 198133  
 COPYRIGHT 2003 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: *Yersinia enterocolitica* polysaccharide-sensitised blood corpuscles - bonded with fixed erythrocytes via coupling agent, esp. tannic acid

PRIORITY-DATA: 1979JP-0157909 (December 5, 1979)

## PATENT-FAMILY:

PUB-NO

PUB-DATE

LANGUAGE

PAGES

MAIN-IPC

JP 56079957 A

June 30, 1981

004

INT-CL (IPC): G01N 33/54

ABSTRACTED-PUB-NO: JP 56079957A  
 BASIC-ABSTRACT:

*Yersinia enterocolitica* polysaccharide-sensitised blood-corpuscles where *Yersinia enterocolitica* polysaccharide is bonded with fixed erythrocytes via coupling agent. Coupling agent is pref. tannic acid but may also be glutaraldehyde or chromium chloride. *Yersinia enterocolitica* polysaccharide antibody may be detected by contacting sensitised blood-corpuscles where *Yersinia enterocolitica* polysaccharide is bonded with fixed erythrocytes via coupling agent to human humor or its diluted liquor and observing agglutination image by microtitration method.

*Yersinia enterocolitica* infects human being and causes various diseases such as ileitis terminalis, appendicitis, erythema nodosum, arthritis, septicemia, hepatic abscess, pulmonary abscess and osteomyelitis. *Yersinia* diseases may be differentiated and diagnosed at high sensitivity and specifically. Fixed erythrocytes may be produced e.g. as follows: Raw erythrocytes suspended in Alsever liquor are treated with carbon monoxide gas, formalin, is added into erythrocytes to fixate. *Yersinia enterocolitica* polysaccharide sensitised to erythrocytes may be any one of Boivin Antigen, glycolipid or alkali polysaccharide and antigen of any one is specific antigen in serum form of *Yersinia* and alkali polysaccharide give most highest antibody value.

Those polysaccharides inhibits specificity to serum form of *Yersinia* and does not inhibit common antigenicity with other bacteria sensitised to fixed erythrocytes.

**[Date of extinction of right]**

**Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office**